

Aus dem Institut für Rechtsmedizin der Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. F. Schleyer

KRITISCHE GRUNDLAGENVERSUCHE ZUR
IMMUNELEKTROPHORETISCHEN DIFFERENZIERUNG DER
INDIVIDUALITÄT MENSCHLICHER SEREN

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität zu Marburg
vorgelegt von —

GODEHARD OEPEN
—
aus Freiburg

Marburg 1974
—

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg (Lahn)

Aus dem Institut für Rechtsmedizin der Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. F. Schleyer

KRITISCHE GRUNDLAGENVERSUCHE ZUR
IMMUNELEKTROPHORETISCHEN DIFFERENZIERUNG DER
INDIVIDUALITÄT MENSCHLICHER SEREN

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität zu Marburg
vorgelegt von

GODEHARD OEPEN
aus Freiburg

Marburg 1974

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg (Lahn)



Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Universität am 5.7.1974

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. H. Oepen

Referent: Prof. Dr. F. Schleyer

Correferent: Prof. Dr. phil. H.-G. Schwick

Inhalt

	Seite
A. <u>Einleitung</u>	3
B. <u>Kritische Untersuchungen über die Eignung der</u> <u>von LAUDEL und Mitarbeitern angegebenen und</u> <u>von ROSEMEYER nachgearbeiteten Methode</u>	5
I. Allgemeine Grundlagen und Literatur	5
II. Eigene Versuche	10
1. Methode	10
2. Meßverfahren nach LAUDEL und Mitarbei- tern zur Identitätsprüfung	14
3. Optimale Technik nach ROSEMEYER	19
4. Vorversuche	22
5. Hauptversuche	29
6. Besprechung	37
C. <u>Versuche mit der LAURELL-Elektrophorese</u>	40
I. Vorbemerkung	40
II. Allgemeine Grundlagen und Literatur	40
III. Eigene Versuche	42
1. Optimale Technik	42
2. Vorversuche	46
3. Hauptversuche	50
4. Besprechung	56
D. <u>Zusammenfassung</u>	58
<u>Addendum</u>	60
E. <u>Literatur</u>	62

A. Einleitung

Die Individualität eines Menschen drückt sich in den verschiedensten Bereichen menschlicher Existenz aus. Diese Erkenntnis hat schon die Philosophen des Altertums beschäftigt. Erst viel später fand sie auch Beachtung in der Morphologie. Für die forensische Medizin ist es von Bedeutung, die Individualität und persönliche Identität eines Menschen mit sicheren Methoden so eindeutig wie möglich zu bestimmen. Ein Weg unter vielen anderen besteht darin, die Serumproteine auf diejenigen Merkmale hin zu untersuchen, die einen genetisch bedingten Polymorphismus aufweisen und möglichst wenig anderen Einflüssen unterliegen. Solche Merkmale können dann mit speziellen Methoden einzeln oder mit einer einzigen Methode gleichzeitig erfaßt werden. Untersuchungen der einzelnen Merkmale sind bereits in der Routine üblich, eine Übersichtsuntersuchung im Sinne einer summarischen Auswertung der genetisch bedingten Polymorphismen noch nicht.

Es war Ziel dieser Arbeit, verschiedene Methoden auf ihre Eignung hin zu prüfen, mit einer solchen Übersicht die Individualität eines menschlichen Serumproteinmusters meßbar festzustellen. Dabei war zu vermuten, daß außer den bereits bekannten noch

weitere Polymorphismen in Erscheinung treten könnten. Bei den genetisch bedingten Eigenschaften der Serumproteine interessierte nicht, um welches Merkmal es sich handelt, oder wodurch diese oder jene Eigenschaft bedingt sei, sondern ob überhaupt interindividuelle Differenzen in genügendem Ausmaß und so konstant auftreten, daß sie im Rahmen der zur Verfügung stehenden technischen Möglichkeiten eindeutig zu erfassen und zu reproduzieren sind.

Es wurden zwei Methoden angewandt:

1. Die Immunelektrophorese (IEP) im Agar-Gel nach SCHEIDEGGER mit einer Auswertung nach LAUDEL u.A.
2. Die sog. "Antigen/Antibody Crossed Elektrophoresis", kurz LAURELL-Elektrophorese (LAURELL-EP), die in Anlehnung an STEPHAN und FRAHM ausgewertet wurde.

B. Kritische Untersuchungen über die Eignung der
von LAUDEL und Mitarbeitern angegebenen und von
ROSEMEYER nachgearbeiteten Methode

I. Allgemeine Grundlagen und Literatur

Die Methode der IEP, wie sie von GRABAR und WILLIAMS 1953 entwickelt und von SCHEIDEGGER modifiziert wurde, ist im wesentlichen eine qualitative Methode. Sie beruht darauf, daß sich die Serum-eiweiße durch verschiedene Ladung, räumliche Struktur, Gewicht und Antigenität unterscheiden. Diese Tatsache nutzt man aus zur Darstellung der einzelnen Serumproteinfraktionen. Dabei sind verschiedene Wege beschritten worden. OUCHTERLONY untersuchte bereits 1952 das Verhalten von Antigen-Antikörper-Reaktionen in einem Trärgel. Er wendete das Prinzip der radialen Diffusion an und konnte so Aussagen über immunologische Identität oder Nicht-identität von Eiweißproben machen. GRABAR und WILLIAMS verbanden 1953 in genialer Weise das Prinzip der einfachen Elektrophorese (EP) mit dieser neuen immunologischen Technik und konnten so in einer einzigen Methode die Serumeiweiße sowohl nach ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit, als auch nach ihren immunologischen Eigenschaften von-

einander trennen.

Hierbei wird zuerst eine normale EP in Agar-Gel vorgenommen, anschließend läßt man die aufgetrennten Eiweißfraktionen senkrecht zur ersten Ausbreitungsrichtung gegen einen mit Antiserum gefüllten Kanal diffundieren. Je nachdem, ob polyvalentes oder spezifisches Antiserum gewählt wurde, kann man mehrere oder nur ganz bestimmte Proteine darstellen. Die ausgefällten Antigen-Antikörper-Komplexe haben eine sichelförmige Gestalt.

Die Methode ist sehr schlecht standardisierbar (HILGERMANN, KÜHN), so daß aus ihr keine quantitativen Rückschlüsse gezogen werden können. Dagegen gibt sie sehr gute Resultate auf dem Gebiet der qualitativen Diagnostik. Nach der Einführung der Mikromethode nach SCHEIDEGGER 1955 fand die IEP Eingang in die Laboratorien. Die Untersuchungen werden hierbei auf Objektträgern statt auf größeren Glasplatten vorgenommen, so daß weniger Antiserum benötigt wird, und die Methode wirtschaftlicher ist.

Mit Hilfe der IEP wurden neue Proteine entdeckt und ihr Verhalten untersucht. Dabei wurden verschiedene Trägermedien auf ihre Verwendbarkeit hin geprüft; so gab SMITHIES 1955 eine IEP in Stärkegel an, CONSDEN und KOHN nennen 1959 die Zellulose-Acetat-Folie (CAF) als neues Medium. Von ihrer jeweiligen Eignung wird später noch die Rede sein.

Bis 1966 wurden so 34 verschiedene Human-Plasma-proteine dargestellt (SCHULTZE und HEREMANS). Manche von ihnen zeigen genetisch bedingte Polymorphismen: die Systeme Hp, Gm, Gc, Inv, ISf, Am, Xm, Ag, Lp, Transferrine, α_1 -Antitrypsin, α_1 -saures Glykoprotein, Coeruloplasmin, C3-Komponente des Komplements, ferner die Gerinnungsfaktoren VIII und IX.

LAUDEL u. A. haben 1962 in einer kurzen Mitteilung über den Vergleich von Pherogrammen verschiedener und gleicher Seren miteinander berichtet. Die Pherogramme waren durch polyvalentes Immunserum gewonnen. Die Autoren gaben eine einfache Methode zur Auswertung der Unterschiede an und behaupteten, auf diese Weise sicher die Identität oder Nichtidentität von zwei Serumproben angeben zu können. An diese Arbeit knüpfte die von HUMMEL und MIRMIRAN 1965 gemachte Untersuchung mit Immunopherogrammen verwandter und nichtverwandter Personen an. Sie blieb aber ohne wesentliches Ergebnis.

1970 untersuchten dann ROSEMEYER und SCHLEYER die Identität von Serumproben mit der von LAUDEL u. A. angegebenen Methode unter verschiedenen Bedingungen und konnten die Befunde LAUDELs in gewissem Rahmen bestätigen.

Mit der vorliegenden Arbeit sollte nun versucht werden, die Methodik zu verbessern und zu prüfen, inwieweit sie geeignet sei, die Unterschiede von

Immunopherogrammen bei verwandten und nichtverwandten Personen objektiv meßbar zu erfassen.

Außer den bereits erwähnten Variationen, die auf genetischen Polymorphismen beruhen, treten in vivo auch anders bedingte Unterschiede auf. Hierzu zählen neben normalen Tagesrhythmuusschwankungen und alters- oder geschlechtsgebundenen Schwankungen (GANROT u. SCHERSTEN) die Veränderungen, die im Laufe von Krankheiten auftreten. Sie sind meist quantitativer Natur, so zum Beispiel der Albuminabfall bei Nephritiden, die Vermehrung der Lipoide bei Lipidnephrose (WUNDERLY), Vermehrung der γ -Globuline bei Morbus Waldenstroem usw. Sie können aber auch qualitativer Natur sein, sei es, daß die Position sich ändert, sei es, daß überhaupt neue Komponenten auftreten. So berichten PROKOP und Mitarbeiter über ein besonderes Schwangerenprotein sowie über Veränderungen des Gc- und α_2 -Makroglobulin-Bereiches bei Kindern. Allgemein bekannt dürfte in diesem Zusammenhang das Auftreten von Paraproteinen bei verschiedenen Krankheiten sein. Eine Positionsänderung kann auf eine Ladungsänderung, eine Veränderung der Molekularstruktur oder der Antigenität zurückgehen. Derartige Beobachtungen machte DUCKSTEIN bei Patienten mit Krankheiten des Urogenitaltraktes, des Pankreas und der Schilddrüse. Als letzte Möglichkeit kann ein Präzipitat völlig fehlen. Das kann folgende

Ursachen haben: vollständiges Fehlen der Anlage, dieses Protein zu bilden (Aglobulinämie, A- β -lipoproteinämie, A-transferrinämie, Analbuminämie), Störung der Synthese des betreffenden Eiweißes, Ausschaltung des richtig gebildeten Proteins durch krankhafte Prozesse wie Autoimmunkrankheiten, Gewebsbindung usw.

Diese Schwankungen stellen eine Fehlerquelle dar; sie wurde hier jedoch dadurch umgangen, daß nur Blut von klinisch gesunden, erwachsenen Personen verwendet wurde. Davon abgesehen sind etwa auftretende Anomalien für die Trägerperson spezifisch und erhöhen so eher die Zahl der individuell geprägten Merkmale der betreffenden Person, was im Rahmen dieser Arbeit nur erwünscht sein konnte.

In vitro können folgende Faktoren die Zusammensetzung der Serumeiweiße verändern:

1. Proteolyse durch Serumfermente,
2. Proteolyse durch Bakterieneinwirkung,
3. Nebenwirkungen von Konservierungsmitteln.

Am anfälligsten sind die Lipoproteine und die Komponenten der β -Globulinfraktion (WIEME). Allgemein nehmen Unbeständigkeit und Schwund der Nachweisbarkeit in dieser Reihenfolge zu: Albumin- γ -Globuline - α_2 -Makroglobulin - Transferrin und andere Proteine, die meistens feinere Präzipitate bilden.

Im Vollblut kommen noch Hämolyse und verstärkte

Proteolyse durch freiwerdende Zellenzyme hinzu. Um alle diese Einflüsse auf die Serumproteinstruktur auszuschalten, wurde im Rahmen dieser Arbeit nur frisch und ohne Zusatz von Konservierungsmitteln entnommenes und sofort nach der Gerinnung zentrifugiertes Blut verwendet.

II. Eigene Versuche

1. Methode

Die Darstellung von Proteinen durch die IEP besteht aus mehreren Arbeitsgängen: Zunächst wird das zu untersuchende Proteingemisch auf ein geeignetes Trägermedium aufgetragen; meistens pipettiert man die Probe in ein vorgestanztes Loch. Von der Geometrie dieses Loches hängt u.a. die Form der wandernden Proteinfront ab.

Wird ein elektrisches Spannungsfeld an den mit einer geeigneten Pufferlösung getränkten Träger angelegt, so trennen sich auf Grund des unterschiedlichen Potentials der Kolloidteilchen die Proteinkörper in mehrere Fraktionen. Der pH-Wert des Puffers wird meistens so gewählt, daß alle Proteine anodenwärts wandern müßten. Dies tun sie jedoch oft

nicht; vor allem die γ -Globuline zeigen starke Tendenzen, kathodenwärts zu wandern. Dieses Phänomen hat folgende Ursachen:

1. Ein geladenes Kolloidteilchen, das sich in einem Puffer befindet, umgibt sich mit kleineren Ionen der gegenteiligen Ladung. Das dadurch hervorgerufene Potential nimmt nach außen hin exponential ab und steht in Beziehung zur Ionenstärke des Puffers: je höher diese ist, desto dichter ist die Ionenhülle um das geladene Partikel, und dadurch ist dessen Ladung um so besser abgeschirmt.

Die elektrophoretische Beweglichkeit ist umgekehrt proportional der Quadratwurzel aus der Ionenstärke. Das bedeutet, daß ein Kolloidteilchen, wie im beschriebenen Falle, immer etwas abgeschirmt ist und nicht so schnell wandert, wie man es erwartet. Dabei spielt noch die das Partikel umgebende Wasserhülle eine Rolle; Partikel plus Ionenhülle plus Wasserhülle nennt man "Kinetic Unit". Allein das Gesamtpotential dieser Kinetic Unit zählt bei der Wanderungstendenz, die ein solches Partikel in einem elektrischen Feld zeigt.

2. Außer der elektrischen Feldstärke, die von einem möglichst homogenen Feld ausgehen sollte, treten noch andere Kräfte auf: hierzu zählen vor allem Reibungskräfte und die Elektro-Osmose. Beide hängen vom Trägermedium ab. "Elektro-Osmose" ist eine Be-

zeichnung für das Phänomen, daß während der EP ein kathodenwärts gerichteter Wasserstrom auftritt. Er hängt mit den strukturegebundenen Ladungen des Trägermediums zusammen. Hinzu kommt noch die Verdunstung durch Wärmeentwicklung, die von der Stromstärke und dem elektrischen Widerstand des Trägers abhängt. Auch dieser Vorgang bewirkt einen Wasserflux, der in diesem Falle auf das Zentrum des Objektträgers hin gerichtet ist.

Alle diese Faktoren können mannigfache Einflüsse auf das zum Schluß vorliegende Präzipitationsbild ausüben. Ihre Beherrschung und Standardisierung ist nur begrenzt möglich (WIEME).

Nach der Beendigung der EP, bei der das mit Bromphenolblau angefärbte und so markierte Albumin eine Strecke von etwa 3 cm zurückgelegt hat, füllt man tierisches Antihumanserum in einen parallel zur Wanderstrecke gestanzten Kanal. Anschließend folgt radiale Diffusion der beiden Fraktionen gegeneinander. Die Lage, Stärke und Form der Präzipitationslinien hängen ab von einem bestimmten Verhältnis der Konzentrationen von Antigen zu Antikörper. Dieses ist unterschiedlich, je nachdem, von welchem Tier das Antiserum gewonnen wurde. In dieser Arbeit wurde in Anlehnung an ROSEMEYER Pferde-Antiserum genommen, da es angeblich feinere und empfindlichere Präzipitate liefert als z.B. Kaninchen- oder Ziegenantiserum.

Nach Auswaschen des Proteinüberschusses an Antikörpern und vorsichtigem Trocknen kann das Präparat mit spezifischen Proteinfärbungen wie Azocarmin oder Amidoschwarz 10 B behandelt werden. Die so besser sichtbar gemachten Präzipitate sind nach ihrer Lage oder Wanderungstrecke zu einem Bezugspräzipitat festgelegt. Sie können variieren im Zeitpunkt ihres Auftretens, ihrer Lage, Stärke und Länge. Eine Veränderung dieser Größen bewegt sich immer in Richtung der geringeren Konzentration von Antigen oder Antikörper. So wird eine geringere AG-Konzentration eine Verlagerung des Präzipitates in Richtung Antigenreservoir zur Folge haben und umgekehrt.

Die Präzipitate können nun qualitativ nach Anzahl und gegenseitiger Lage beurteilt werden. Auch eine semiquantitative Abschätzung der Präzipitate an Hand ihrer Form, Dicke und Länge und ihres Abstands vom Antigenreservoir ist möglich. Jeder quantitative Unterschied von Antigen oder Antikörper kann die Stärke und/oder Länge verändern (LAUDEL u. A.).

Zusammenfassend seien nochmals die Faktoren, die das Präzipitationsbild beeinflussen, aufgezählt:

1. Ladung, Struktur, Gewicht, Antigenität und Quantität der Proteine;

2. pH-Wert und Ionenstärke des Puffers, Feldstärke, Elektro-Osmose, Reibung, Verdunstung;
3. Geometrie der Auftragsstelle sowohl von Antigenen, als von Antikörpern;
4. Verhältnis der Konzentrationen von Antigen/Antikörpern.

2. Meßverfahren nach LAUDEL u. A. zur Identitätsprüfung

Differenzen, die beim Vergleich zweier Serumproben hinsichtlich ihres immunoelektrophoretischen Verhaltens auftreten, können also verschiedene, und zwar methodische, pathologische oder genetische Ursachen haben. Treten diese Unterschiede konstant genug auf, bei geringen methodischen und pathologischen Einflüssen, so ist die Wahrscheinlichkeit groß, daß es sich um genetisch bedingte Phänomene handelt. Um sie zu erfassen, braucht man ein Maßsystem.

Bei der Betrachtung einer IEP des gesamten Proteinspektrums mit sich überlagernden Präzipitaten ist es sehr schwierig, die Proteine hinsichtlich ihrer Wanderungsstrecke oder Lage zu charakterisieren. Dies bereitet selbst bei großer Kenntnis der relativen Lage der jeweiligen Proteine erhebliche

Mühe und bleibt subjektiv und unsicher. Deshalb erhebt sich die Forderung nach einem objektiven Maßsystem und einem Meßverfahren, das reproduzierbar ist.

In der Literatur werden zwei verschiedene Meßmethoden angegeben. HUMMEL und MIRMIRAN haben bei Serumuntersuchungen verwandter und nichtverwandter Personen den Objektträger nach dem Trocknen des Agars zerschnitten und zur Auswertung die beiden spiegelsymmetrischen IEP-Bilder aufeinandergelegt. Neben der durch Überlagerung erschwerten Beurteilung fehlt hier vor allem ein objektives Maß für den Grad einer Präzipitatveränderung (unterschiedliche Länge oder Lage einer Linie). Diese kann meistens nur alternativ gemessen werden (Verschiebung oder Fehlen eines Präzipitates vorhanden oder nicht).

Ein anderes Verfahren hatten LAUDEL u. A. beschrieben. Sie vermieden den Nachteil der Subjektivität insofern, als sie einen Raster auf das Immunophorogramm von zwei in demselben Arbeitsgang unter denselben Bedingungen gelaufenen Serumproben auflegten. Jede Rasterlinie wird für jedes der beiden sich gegenüberliegenden Pherogramme auf die Anzahl der jeweiligen Schnittpunkte mit Präzipitationslinien durchgesehen, und die Zahl der Schnittpunkte pro Serum und pro Rasterlinie notiert. Da die Rasterlinien senkrecht zur elektrophoretischen Aus-

breitungsrichtung verlaufen, vergleicht man bei beiden Seiten die Orte, die sich entsprechen müssen. Die Anzahl der positiven oder negativen Differenzen des einen zum anderen Serum, die beide als absolut angesehen werden, gilt als Maß für Identität oder Nichtidentität.

Die letztgenannte Methode ist einfach und benötigt keine genaue Zuordnung eines Präzipitats. Ihr Vorteil gegenüber der Methode von HUMMEL besteht in einer größeren Objektivität und Reproduzierbarkeit. Doch bleibt auch hier die Subjektivität bei der Beurteilung der Schnittpunkte, vor allem bei schwachen Linien, bei überlagerten Linien und am Anfang und Ende der Präzipitate relativ groß. Außerdem werden Veränderungen, die sich in der Entfernung zur Antiserumrille, in der Stärke der Präzipitate oder in der Bogenform ausdrücken, nicht erfaßt.

ROSEMEYER und SCHLEYER versuchten, die Fehlerquellen zu reduzieren, indem sie bei feinen und dünnen Linien großzügig verfahren, jede erkennbar fortführende Verfärbung mitzählten und bei Überlagerungen die Anzahl der durch- oder auslaufenden Präzipitate einzeln werteten und nicht nur die zusammenfallenden Linien als eine. Außerdem entwickelten sie eine Darstellungsart, die etwas von der LAUDELschen Graphik abweicht: sie stellten die ausgewerteten Serumpaare in einem Koordinatensystem dar.

Dabei wurden auf der Abszisse die jeweilige Quersumme aller über alle Rastereinheiten gefundenen Differenzen aufgetragen; auf der Ordinate wurde jeweils die Quersumme abgetragen, die entsteht, wenn man nach LAUDEL u. A. alle Differenzen um 1 vermindert und dann addiert. Auf diese Weise wurde eine graphische Trennung von identischen und nichtidentischen Serumpaaren erzielt, obwohl die Ordinate im Grunde genommen keine neue Information zu den Werten der Abszisse bringt.

Für die vorliegende Untersuchung wurde dieses Prinzip übernommen. Ausgezählt wurde jedoch mit der Stereolupe. Der Raster war nunmehr in eine Petrischale eingeritzt, der Rillenabstand betrug 2 mm. Eine Pappschablone hielt den Objektträger fest am Platz. Oberster Grundsatz war eine gleichartige Zählung beider zugehöriger Seren nach der oben angeführten Methode.

Es muß betont werden, daß durch das Zahlenpaar der jeweiligen Abszissen- und Ordinatenwerte nur eine Aussage über die beiden auf demselben Objektträger untersuchten Serumproben möglich ist.

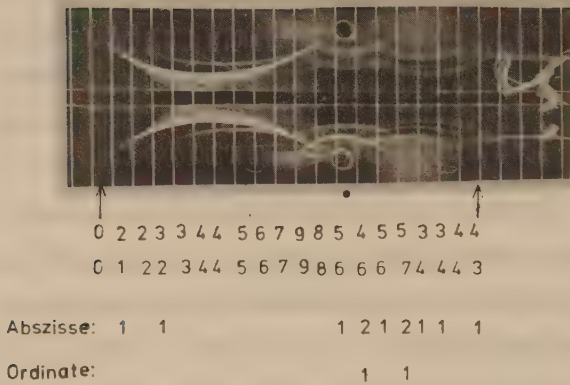


Abb. 1. Beispiel der IEP eines Serumpaars und deren Auswertung (Pfeile: Beginn der Zählung)
 Nr. 2 der Vorversuche
 je 1 μ l Serum von einer Mutter und ihrem Kind,
 75 μ l Antihumanserum vom Pferd (Behringswerke)
 • = Lage des Startloches

Die Zahlenreihe (Abb.1) entspricht den "Raster-
 einheiten". Die ersten beiden Zahlenreihen enthalten
 die jeweilige Anzahl von Schnittpunkten für die bei-
 den Serumproben. In den beiden folgenden Reihen wur-
 den die jeweils für die Ordinate oder Abszisse nöti-
 gen Differenzen gebildet. Deren Quersumme ergibt den
 Abszissen- und Ordinatenwert, in diesem Falle also
 11/2.

3. Optimale Technik nach ROSEMEYER

Etwa 2-2.5 ml heißer 1.5% Agar, gelöst in Puffer-Aqua dest. 1:1 (0.9 g Agar plus 30 ml Puffer plus 30 ml Aqua dest.) werden auf einen genau waa-gerecht liegenden Objektträger pipettiert, der vorher fettfrei gemacht wurde (Chromschwefelsäure). Damit der Agar besser haften bleibt und beim späteren Wässern nicht vom Objektträger schwimmt, sowie um zu vermeiden, daß die Serumproben zwischen Agar und Glas gelangen, empfiehlt sich ein vorhergehendes dünnes Einpinseln mit Agar und Trocknenlassen (HILGER-MANN 1967). Sobald der Agar erstarrt ist, werden mit einer speziellen Stanze Antiserumkanal und Antigenreservoir ausgestanzt.¹⁾

Es wird so ausgestanzt, daß die Antigenreservoir 5 mm vom Antiserumkanal entfernt und näher als gewöhnlich der Kathodenseite liegen. Dies deshalb, da so eine größere Trennstrecke für die im Rahmen dieser Arbeit besonders interessanten α - und β -Globuline zur Verfügung steht; auf die γ -Globuline, die dann zu weit kathodenwärts wandern, wurde wegen ihrer Schwankungen verzichtet.

Die Antigenreservoirs werden mit zugeschliffenen Metallröhrchen vom Durchmesser 1.4 mm vorsichtig

1) Den Behringwerken Marburg sei an dieser Stelle für das freundliche Überlassen einer solchen Stanze gedankt.

abgesaugt, wobei die Sogstärke der Wasserstrahlpumpe nicht zu stark sein darf; die richtige Einstellung wird empirisch ermittelt. Anschließend können die so präparierten Objektträger in der feuchten Kammer bis zur Benutzung aufbewahrt werden, maximal 3 Tage.

Nachdem die Träger auf die waagerechte Brücke der EP-Kammer gelegt worden sind, wird der Puffer fast bis auf das Niveau der Objektträger in die Reservoirs eingefüllt, um einen möglichst geringen Spannungsabfall und eine minimale Wärmeentwicklung zu erreichen. Der Kontakt zwischen Gel und Elektropuffer wird durch Filterpapier (Schleicher & Schüll 2043 b mgl) hergestellt, das ungefähr 1.5 cm weit auf dem Objektträger aufliegt und tief genug in die Pufferflüssigkeit hineinreicht.

Nach Einfüllen von 1 μ l Serum wird die Spannung angelegt. Das zu untersuchende Serum wurde aus Nativeblut gewonnen, das gleich nach der Gerinnung 5 min. bei 3000 U/min zentrifugiert wurde. Die Spannung beträgt bei Messung an den Objektträgerenden ungefähr 50 V, was einer Feldstärke von etwa 7 V/cm entspricht. Die Elektroden sollten nicht punktförmig sein, sondern von gleicher Länge wie die Pufferwannen, damit entlang der Brücke kein Spannungsabfall herrscht, und alle Elektrophoresen gleichweit und gleichschnell laufen. Die Trennung, die in einer

feuchten Kammer stattfindet, sollte nach 45 bis 90 min. beendet sein. Nach der EP wird der vorher gestanzte Antiserumkanal sauber mit einer Nadel ausgehoben und das Antiserum einpipettiert. Jede Beschädigung der Kanalkanten führt zu Verzerrungen der Präzipitate. Die Mengen an Serum und Antiserum variieren je nach Größe und Lage des Antiserumkanals und Antigenreservoirs sowie der Konzentration des Antiserums und sind empirisch zu ermitteln. Für die vorliegende Untersuchung wurde Antihuman-serum vom Pferd (Hersteller: Behringwerke) verwendet, und zwar 70-80 μ l pro IEP bei 1 μ l Probanden-serum.

Anschließend verbleibt der so beschickte Objekt-träger 20₊₄ Stunden zur Immundiffusion in der feuchten Kammer. Sodann wird das überschüssige Antiserum je 12 Stunden mit 1% NaCl-Lösung und Aqua dest. ausgewaschen. Danach wird der Agar mit einem feuchten Filterpapier bedeckt und über Nacht zum Trocknen bei Zimmertemperatur aufgestellt. Dann wird das Filterpapier vorsichtig abgezogen, und die anhaftenden Papierflöckchen werden unter fließendem Wasser mit dem Finger abgeschoben. Nach 2 min. Wässern wird etwa 7 min. gefärbt. Anschließend wird in mehreren Bädern so lange entfärbt, bis keine Farbwolken mehr abgehen.

Als Pufferlösung ist heute der Veronal-Puffer

am gebräuchlichsten Es wurde auf Empfehlung von ROSEMEYER ein nach HIRSCHFELD modifizierter Puffer angesetzt, der optimal auftrennt, aber nur einmal verwendet werden kann:

<u>Elektrodenpuffer:</u>	Veronal	6.9 g
	Na-Veronal	43.8 g
	Ca-Lactat	1.92 g
	Aqua dest.	ad 5000 ml

<u>Agarpuffer:</u>	Veronal	1.66 g
	Na-Veronal	10.51 g
	Ca-Lactat	1.53 g
	Aqua dest.	ad 1000 ml

<u>Färbelösung:</u>	Amidoschwarz 10 B, 5% in
	9 Teilen Methanol und
	1 Teil Eisessig

<u>Entfärbelösung:</u>	100 ml Eisessig
	900 ml Methanol

<u>NaCl-Bad:</u>	0.9% NaCl-Lösung
------------------	------------------

4. Vorversuche

a) Zunächst wurde versucht, die von ROSEMEYER angegebene Methode zu verbessern. ROSEMEYER hatte mit einem von SCHNEIDER und BERNDT angegebenen Puffer gearbeitet, bezeichnet aber den Puffer nach

HIRSCHFELD als überlegen. In der vorliegenden Arbeit wurde daher dieser Puffer verwendet. Ferner wurden Färbeversuche mit Azocarmin und Amidoschwarz angestellt, die ergaben, daß Amidoschwarz die schärfsten Ergebnisse liefert. Die Anregung ROSE-MEYERS, auf Zellulose-Acetat-Folie zu arbeiten, wurde geprüft. Auskünfte sowie Vorversuche in mehreren Laboratorien¹⁾ ergaben jedoch, daß Zellulose-Acetat-Folie (ZAF) für unsere Fragestellung in der IEP gegenüber dem Agargel unterlegen war, da im Agar schärfere Präzipitate entstanden.

Das hängt mit folgender Tatsache zusammen: Agar als Polysaccharid besteht zu 99% aus Wasser. Dadurch werden Ergebnisse erzielt, die der freien EP nach TISELIUS entsprechen. Im Agar können, bedingt durch die Porengröße, Teilchen vom Molekulargewicht bis zu 1 Million frei diffundieren. Ein Nachteil besteht darin, daß Agar keine chemisch-definierte Verbindung ist, d.h. er ist von wechselnder Beschaffenheit und nicht genau berechenbaren Eigenschaften. Er enthält außerdem viele freie Sulfoniumgruppen und weist daher einen hohen elektro-osmotischen Effekt auf (s. o. Abschnitt B II 1). Sein großer Vorteil besteht jedoch darin, daß er scharfe Präzipitate

1) Herrn Prof. Dr. Clotten, Klinisches Laboratorium der Medizinischen Universitätsklinik Freiburg, und Herrn Dr. K. Schönherr, Laboratorium für klinische Chemie, Lörrach, danke ich für freundliche Hinweise und Einführung in die Methode.

entstehen läßt, weil man Serum und Antiserum in einer genau senkrechten Front aufeinander zudiffundieren lassen kann; denn das Serum und Antiserum wird in Reservoirs gefüllt, die genau senkrecht bis auf das Glas des Objektträgers ausgestanzt und abgesaugt wurden.

Bei der ZAF ist dies nicht der Fall. Sie ist zwar eine chemisch genau definierte Verbindung; bei ihr ist jedoch die Wanderungsfront von Serum und Antiserum keilförmig! Das kommt dadurch zustande, daß das Serum und das Antiserum nur in Vertiefungen der Folie eingefüllt werden, so daß sowohl eine Diffusion nach unten, als auch nach der Seite stattfindet. Dieser Keil verwischt die Schärfe des Präzipitates. Der Vorteil der ZAF, einfacher und schneller verwendbar zu sein, ohne den Nebeneffekt der Elektro-Osmose, und die Möglichkeit, die ZAF künstlich transparent zu machen, werden wertlos durch die unscharfen Präzipitate.

b) Daneben wurde versucht, die Dokumentation und Auswertung der Immunopherogramme zu verbessern, indem sie auf Fotopapier vergrößert wurden. Die Technik war folgendermaßen: Der Objektträger mit dem Pherogramm wird in einer Petrischale, in die der Raster für die Auswertung eingeritzt ist, wie ein Negativ zwischen Kondensor und Objekt eines Vergrößerungsapparates geschoben, so daß bei Belichtung ein ver-

größtes Abbild auf dem Fotopapier entsteht. Dabei ist es nicht unbedingt nötig, den Objektträger wegen besserer Transparenz im Agarpuffer baden zu lassen; außerdem entfärben sich dabei die Präzipitate zusehends. Die Fotografien, die ohne Pufferbad mit trockenen Objektträger gemacht wurden, unterschieden sich nicht von solchen, bei denen der Objektträger in Puffer gebettet war.

Leider waren aber auf den Fotografien die schwächeren Linien kaum oder gar nicht zu erkennen. Deshalb wurde die direkte Auswertung des Objektträgers unter der Stereolupe vorgezogen. Dabei waren auch Überlagerungen deutlicher zu trennen. Unter der Stereolupe wurde das Feld mit einem weißen Papier halb bedeckt und die gerasterte Petrischale mit dem Objektträger so daraufgelegt, daß die noch nicht berücksichtigten Rasterlinien auf der weißen Fläche lagen, diejenigen, auf denen die Präzipitatschnittpunkte schon ausgezählt waren, auf der unbedeckten Fläche.

c) Um die Auswaschung des überschüssigen Antiserums zu verbessern und dadurch die Präzipitate schärfer hervortreten zu lassen, wurden nacheinander zwei Schüttelapparate konstruiert, die die Diffusion durch Erzeugen von leichten Wellen und Strömungen im NaCl-Bad erhöhen sollten. Der Effekt war eine Verminderung der sonst immer auftretenden "Grundfärbung". Allerdings wurde das Risiko, daß der Agar

sich vom Objektträger löst, ebenso erhöht.

d) Anfangs wurde mit einer Kammer gearbeitet, die auch ROSEMEYER benutzt hatte. Sie wies aber einen so starken Spannungsabfall auf (60 V entlang der Brücke), daß eine andere Kammer bevorzugt wurde. Diese hatte durchgehende platinisierte Elektroden und nur noch einen sehr geringen Spannungsabfall von etwa 5 V entlang der Brücke.

e) Die Elektrophoresezeit von 70 min. bei ROSEMEYER wurde um das Zweieinhalbfache verlängert, um eine bessere Auftrennung zu erzielen, das Albumin legte dabei eine Strecke von etwa 3.5 cm zurück. Dabei spielte die Überlegung eine Rolle, daß Ladungs- und strukturegebundene Unterschiede der Proteine um so besser zum Vorschein kommen, je länger sie Zeit haben, sich auszuwirken. Die γ -Globuline, die sowieso nicht berücksichtigt wurden, wanderten dabei sehr weit kathodenwärts.

f) Beim Gießen der vorgepinselten Objektträger wurde ein besonderes Pipettierverfahren angewandt: Erst wurden die Ränder durchgehend mit Agar pipettiert, dann davon ausgehend die Mitte des Objektträgers. So wurde ein Herablaufen des Agars vermieden; ohne diese Pipettiertechnik lief der Agar regelmäßig nach Bildung eines großen "Stautropfens" vom Glas herunter.

g) Das Pipettieren der Serumproben in die Auf-

tragslöcher ist außerordentlich schwierig. In der vorliegenden Arbeit wurde 1 μ l Serum aus einer graduierten, 10 μ l fassenden Pipette, deren Spitze nach dem Füllen abgewischt wurde, auslaufen gelassen. Dabei bildete sich ein Tropfen, der über das Auftragsloch gehalten und ihm dann vorsichtig soweit angenähert wurde, bis er von selbst "ansprang". Nur so war es wenigstens einigermaßen möglich, zu pipettieren, ohne daß die Lochränder verletzt wurden, und ohne daß Serumsuren neben die Einfüllöffnung gelangten.

h) Im Verlaufe der Versuche wurden einige Randbeobachtungen gemacht, die Erwähnung verdienen:

1. Es wurde versuchsweise ein Antiserum der Firma Molter verwendet, dessen Verfallsdatum bereits zwei Jahre zurücklag. Die Ergebnisse waren ohne Ausnahme tadellos, ein Unterschied zu neuen Antiseren war nicht festzustellen.

2. Die Serumproben müssen vor Gebrauch gut durchgeschüttelt werden, da sich im Kühlschrank bei längerem Stehen eine Entmischung einstellt, und so falsche Ergebnisse durch Fehlen oder Verminderung einiger Proteine auftreten können.

3. Die Anodenseite des Objektträgers wird regelmäßig wärmer als die Kathodenseite. Das äußerte sich in größerer Verdunstung anodenwärts und in einer deutlichen Abflachung des Agars an der Stelle,

wo anodenseitig das Filterpapier auflag. Ein triftiger Grund konnte für diese, auch bei anderen EP häufig gemachte Beobachtung nicht gefunden werden. Dieses unvermeidbare Phänomen war aber geringfügig und trat konstant auf, so daß es keine Fehlerquelle darstellt.

4. Die Spannung am Objektträger wurde regelmäßig während eines Laufs geprüft und mußte vor allem zu Beginn der EP häufig nachgeregelt werden. Der Grund dürfte im "Anlaufen" der Pufferlösung zu suchen sein. Die Stromstärke betrug pro Kammer am Gerät 40-50 mA.

5. Die Objektträger wurden mit Diamantschreiber numeriert; eine Beschriftung mit Filzstiften (auch wenn sie als wasserfest bezeichnet sind) ist nicht ratsam, da spätestens beim Wässern im NaCl-Bad der letzte Rest der Schrift gelöscht wird.

6. Beim Ausheben des Antiserumkanals ergeben sich Schwierigkeiten! Einfach ist es nur, wenn nicht vorgepinselte Objektträger verwendet werden. Falls aber der Agar auf eine vorgetrocknete Agarschicht aufpipettiert worden war, blieb beim Ausheben des Antiserumkanals mit einem Gelmesser immer ein kleines Häutchen zurück oder wurde teilweise mit herausgehoben. Es klebte in kleinen, zerrissenen Bruchstücken an den Rändern des Antiserumkanals und ragte teilweise darüber hinaus. Versuche, diese Häutchenreste zu ent-

fernen, führten immer zu Beschädigungen am Rand des Antiserumkanals. Da aber die Ergebnisse bei nicht-vorgespinnelten Objektträgern teilweise noch schlechter ausfielen - der Agar schwamm ab, das Serum geriet zwischen Agar und Glas - wurde diese Schwierigkeit in Kauf genommen. Allerdings mußten beschichtete Objektträger, deren Antiserumkanal unebene Ränder aufwies, oft verworfen werden, obwohl sie für rein qualitative Untersuchungen noch geeignet gewesen wären.

5. Hauptversuche

Es gelang im Verlauf der Vorversuche nicht, reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen. Das heißt: Wiederholungsläufe mit identischen Serumpaaren ergaben stark voneinander abweichende Resultate! Da aber die Voraussetzung für eine Aussage, wie sie LAUDEL u. A. und auch ROSEMEYER gemacht haben, die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ist, wurde im ersten Hauptversuch geprüft, wie groß die Streuung der Werte für identische Serumpaare ausfällt.

Zu diesem Zweck wurde von einer klinisch gesund erscheinenden erwachsenen Person mit einer sterilen Venüle 5 ml Blut entnommen; nach der Gerinnung wurde es 5 min. bei 3000 U/min zentrifugiert, das Serum abgegossen und im Kühlschrank aufbewahrt. Die Objekt-

träger wurden, wie oben ausgeführt, vorbereitet, mit dem Serum beschickt und so lange in der EP-Kammer belassen, bis das mit Bromphenolblau markierte Albumin eine Strecke von etwa 3.5 cm zurückgelegt hatte. Die weitere Behandlung folgte wie oben beschrieben.

So wurde an 3 aufeinanderfolgenden Tagen 23 mal dasselbe Serum mit sich selbst verglichen. Die Auswertung (siehe B II 2) ergab, daß die Wertepaare von 7/0 bis 18/7 streuten. Eine eindeutige Gruppierung der Werte, wie nach ROSEMEYERs Angaben zu erwarten gewesen wäre, trat also nicht ein. Eine Übersicht über dieses Ergebnis geben Abb.2 und Tab.I.

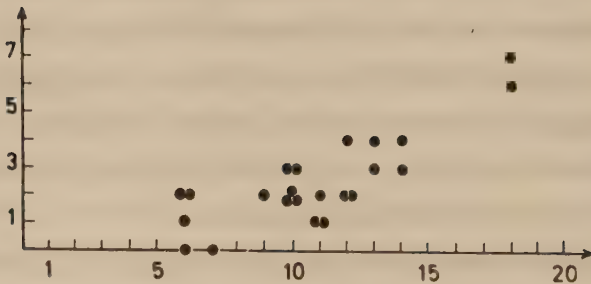


Abb.2. Ergebnis des Vergleichs von 23 Pherogrammen desselben Serums von einer Blutentnahme. Abszisse: Quersumme der Differenzen, Ordinate: Quersumme der Differenzen nach Abzug von jeweils 1

Tab.I. Wertepaare der 23 ausgewerteten Pherogramme des ersten Hauptversuchs

Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8
Wert	14/4	12/4	6/1	11/2	10/2	13/3	9/2	10/3

Nr.	9	10	11	12	13	14	15
Wert	11/1	10/2	10/3	12/2	6/0	14/3	18/7

Nr.	16	17	18	19	20	21	22	23
Wert	10/2	18/6	6/2	7/0	13/4	12/2	11/1	6/2

Um ROSEMEYERs Angaben möglichst objektiv, d.h. unter Ausschaltung von Wunschvorstellungen beim Auswerten, nachzuprüfen, wurde nun ein Blindversuch unternommen. Eine dritte Person verschlüsselte die Serumproben zweier Probanden und gab den Schlüssel erst nach der Auswertung preis. Die Serumproben wurden von zwei nichtverwandten, geschlechtsverschiedenen, klinisch gesund erscheinenden erwachsenen Personen gewonnen.

Mit diesen, auf 6 Reagensgläser verteilten, verschlüsselten Serumproben wurden 37 Läufe gestartet. Auf Grund einiger Anhaltspunkte, die für technische Mängel sprachen, wurden 4 von ihnen verworfen, 33 wurden gewertet. Nach Entschlüsselung stellte sich heraus, daß 12 identische und 21 nichtidentische Serumpaare gelaufen waren.

Die Auswertung ergab, daß für nichtidentische Serumpaare Werte von 9/0 bis 29/11 auftraten und für identische die Werte von 6/0 bis 28/12 streuten. Ohne Entschlüsselung war es unmöglich, zu sagen, welcher von den Objektträgern ein identisches und welcher ein nichtidentisches Serumpaar enthielt!

Dies wird anschaulich in Abb. 3 und Tab. II.

Tab. II. Serumpaare des ersten Blindversuchs

a) Identische Serumpaare:	12/1	10/2	28/12	24/11
	16/5	24/9	19/6	12/2
	6/0	9/1	13/2	15/3
b) Nichtidentische Serumpaare:	9/0	13/2	17/2	
	9/1	17/3	12/1	
	11/2	15/5	12/0	
	29/11	19/4	17/5	
	17/2	9/1	20/8	
	20/6	18/5	16/7	
	16/2	14/2	12/0	

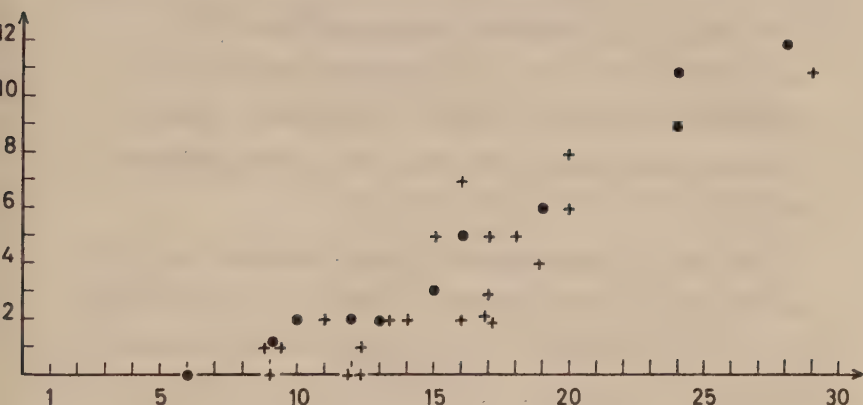


Abb. 3. Diagramm zum ersten Blindversuch

• = identische Serumpaare

+ = nichtidentische Serumpaare

Diese Ergebnisse widersprechen der klaren Auftrennung und Unterscheidung, die ROSEMEYER erzielt hatte. Um die Befunde zu erhärten, wurde ein zweiter Blindversuch ausgeführt, der eine größere Zahl von Versuchen umfaßte.

Es wurden, wie beim vorhergehenden Blindversuch, 2 Serumproben verschlüsselt und mit ihnen 90 Läufe vorgenommen. Von diesen 90 Objektträgern wurden 23 nach strengster Auswahl verworfen (Kriterien: ver-

muteter Pipettierfehler, Absaugefehler, Schwierigkeiten beim Absaugen des Antiserumkanals usw.). Nur 67 Serumpaare wurden zur Auswertung zugelassen. Diese ergab, im Gegensatz zur vorherigen Serie, eine gewisse Trennung, die einigermaßen dem von ROSEMEYER angegebenen Ergebnis entsprach. Ersichtlich wird dies aus der Tabelle III und der Abbildung 4.

Von den 67 Serumpaaren dieses Versuchs waren 29 identisch, 38 nichtidentisch. Wenn man einen Mittelwert für die gezählten Differenzen der identischen Serumpaare berechnet, so erhält man das Koordinatenpaar $17/3$. Der entsprechende Mittelwert für nichtidentische Serumpaare beträgt $21/8$. Zieht man nun eine Grenze genau in der Mitte zwischen beiden Mittelwerten und bezeichnet das Gebiet oberhalb von $19/5.5$ als das Gebiet der nichtidentischen Serumpaare, unterhalb als das Gebiet der identischen Serumpaare, so kommt man zu dem Ergebnis, daß 50 von 67 Serumpaaren im jeweils "richtigen" Bereich liegen, das wären 74.6%. Entsprechend liegen 17 von 67 (= 25.4%) im "falschen" Bereich. Die 6 Röhrchen mit den unbekannten Serumproben konnten ohne Kenntnis der Verschlüsselung richtig zugeordnet werden. Mit einem Fehler von 25.4% konnte also Identität oder Nichtidentität festgestellt werden. Das entspräche etwa der einfachen statistischen Streuung (σ).

Tab. III. Werte der Serumpaare des 2. Blindversuchs

- a) Identisch: 23/5 8/2 11/3 14/2 12/0 21/7 24/6
21/4 10/1 18/4 15/4 12/2 11/2 12/2
27/11 7/0 6/0 16/3 17/2 12/3 16/3
11/2 15/3 7/0 21/6 14/2 14/3 5/0 12/0
- b) Nichtidentisch: 20/7 9/0 15/3 24/11 23/10 13/2
20/8 16/2 22/7 27/14 34/14 30/17
28/9 22/7 26/10 21/6 8/2 21/6
22/9 31/13 28/12 21/9 26/9 15/3
13/2 14/4 22/7 28/10 14/3 27/10
21/7 14/3 18/5 26/8 20/6 28/9
17/6 33/20

Die Ergebnisse von LAUDEL u. A. und speziell von ROSEMEYER konnten also bei diesem zweiten Blindversuch im Wesentlichen bestätigt werden in dem Sinne, daß Unterschiede zwischen identischen und nichtidentischen Serumpaaren mit der angegebenen Methode feststellbar sind, allerdings nicht in derselben Klarheit wie von ROSEMEYER angegeben, und nur bei entsprechend hoher Versuchszahl unter scharfer Auslese aller zweifelhaften Befunde.

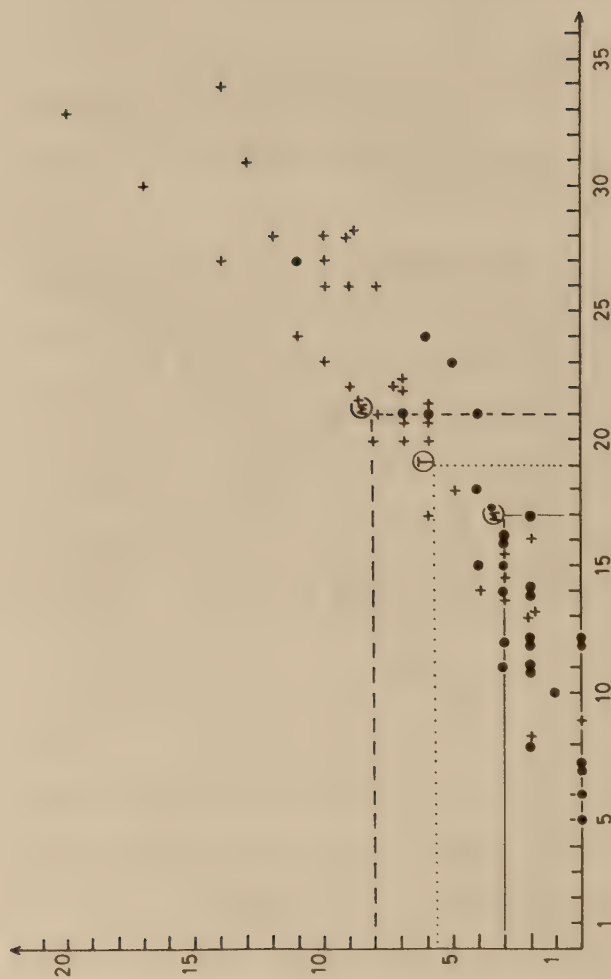


Abb. 4.

Diagramm zum zweiten Blindversuch

• = identische Serumpaare + = nichtidentische Serumpaare

M = Mittelwert T = Grenze zwischen identischem und nichtidentischem Gebiet

6. Besprechung

Obwohl der zweite Blindversuch die Ergebnisse von LAUDEL u. A. und ROSEMEYER im Wesentlichen bestätigen konnte, bleiben doch daneben einige Bedenken bestehen:

1. Erst ein relativ umfangreicher und unter strengsten Bedingungen ausgeführter Versuch zeigte etwa das gewünschte Ergebnis. Kleinere Versuche mit einer geringeren Zahl wiederholter Elektrophoresen waren völlig indifferent und zur Prüfung der Identität ungeeignet. Die Streuung blieb auch beim zweiten großen Blindversuch noch relativ hoch, der Aufwand an Zeit, Material und Mühe stand in keinem angemessenen Verhältnis zum erzielten Ergebnis!

2. Die Methode ist vom Prinzip her qualitativer, höchstens semiquantitativer Natur. Der Versuch, sie nach der Grundmethode von LAUDEL u. A. quantitativ zu verwenden, ist unter anderem aus folgenden Gründen bedenklich: Die Unterschiede, die man feststellt, setzen sich aus einer Summe von Einzelunterschieden zusammen, die wiederum ganz verschiedene Ursachen haben können. Eine Ursache kann möglicherweise genetischer Polymorphismus sein; dieser wird jedoch nur teilweise erfaßt, da nur Länge der Präzipitate und Längsverschiebungen meßbar beurteilt werden können, nicht aber Stärke, Schärfe, Lage zum

Antiserumkanal und Form.

Leider spielen aber die methodisch bedingten Unterschiede eine weitaus größere Rolle als genetisch bedingte. Deshalb ist auch die Methode, wie bereits erwähnt, nicht standardisierbar. Jeder ihrer Schritte, vom waagerechten Gießen bis zum Ausheben des Antiserumkanals mit allen seinen Komplikationen geht mit Fehlern einher, die nie genau kontrollierbar sein werden, es sei denn unter ungeheurem technischen Aufwand.

Außerdem bleibt die Auszählung der Schnittpunkte außerordentlich subjektiv. Um das zu erläutern, seien hier einige Fragen aufgezählt, die sich stellen, wenn man nach der Methode von ROSEMEYER auszählt:

a) Wo ist die Grenze zu ziehen zwischen noch angefärbten schwachen und nicht mehr angefärbten Linien?

b) Handelt es sich hier um ein Färbe-Kunstprodukt oder um eine neue Linie?

c) Sollen scharfe Linien gleich bewertet werden wie unscharfe? Starke wie schwache?

d) Wie soll man ausdrücken, daß ein Unterschied besteht, wenn bei den beiden Serumproben verschiedene Linien auftreten, aber dieselbe Schnittpunktzahl beobachtet wird?

3. Die Annahme einer erbbedingten Individualität des menschlichen Serumproteinmusters ist für einzel-

ne Proteine wie Gm, Inv, Gc, Hp usw., schon länger bewiesen. Eine Aussage über Identität oder Nichtidentität auf Grund einer pauschalen Beurteilung eines Immunopherogrammes aller Serumproteine hat keinen großen Wert, solange sie nicht begründet werden kann. Dazu müssen methodische und andere störende Einflüsse ausgeschaltet oder mindestens kleingehalten werden können. Nur so ist man wirklich sicher, nur die Merkmale persönlicher Individualität, z.B. genetische Polymorphismen, erfaßt zu haben. Bedeutend einfacher und sicherer als mit der hier angewandten Methode läßt sich dies mit herkömmlichen Techniken bewältigen, bei denen spezielle Proteine einzeln auf ihr Verhalten hin untersucht werden. Vor allem sind diese Ergebnisse reproduzierbar.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die von LAUDEL u. A. angegebene und von ROSEMEYER und SCHLEYER nachgeprüfte Methode nicht geeignet ist, die Identität oder Nichtidentität von Serumproben festzustellen, da sie die individuellen Merkmale nicht eindeutig und reproduzierbar erfaßt.

C. Versuche mit der LAURELL-Elektrophorese

I. Vorbemerkung

Eine neue immunelektrophoretische Methode, die im Gegensatz zur einfachen IEP nach SCHEIDEGGER quantitativ auswertbar ist, stellt die "Antigen-Antibody Crossed Electrophoresis" nach LAURELL dar. WHITEHEAD u. A. teilten 1970 mit, daß sie die Identität menschlicher Blutspuren mit dieser Methode feststellen könnten. Das gab den Anstoß, auch diese Methode in die vorliegende Untersuchung einzubeziehen, um zu prüfen, ob sie geeignet sei, über die Frage von Identität und Nichtidentität zweier Serumproben objektiv und reproduzierbar zu entscheiden.

II. Allgemeine Grundlagen und Literatur

LAURELL beschrieb 1965 die sog. "Antigen/Antibody Crossed Electrophoresis". Es handelt sich dabei um eine quantitative Methode, die die Proteinkonzentrationen in Peaks sichtbar macht und daher auch als "quantitative Immunelektrophorese" bezeichnet werden kann.

Es wird in zwei Schritten gearbeitet: zuerst wird eine normale EP vorgenommen; die zweite EP läuft

senkrecht zur ersten Wanderungsrichtung in einen mit Antiserum getränkten Agar hinein.

Diese Methode wurde von CLARKE und FREEMAN modifiziert. Ihr großer Vorteil besteht in der Möglichkeit, die Proteine auf einfache Art quantitativ zu erfassen. Außerdem werden mit ihr etwa doppelt so viele Fraktionen wie mit der bisher üblichen IEP dargestellt. Ein großer Nachteil der LAURELL-Elektrophorese (LAURELL-EP) besteht allerdings in dem enormen Verbrauch an Antiserum. Er wurde durch FIRESTONE u. A. gemildert, indem das Antiserum in kleinerer Menge als bei LAURELL auf der Oberfläche des Agars gleichmäßig verteilt wurde. Erst WHITEHEAD sowie STEPHAN und FRAHM schufen mit ihrer Mikromethode eine brauchbare Lösung. Sie verkleinerten das Format der Glasplatte von 10 x 10 cm auf 5 x 5 cm und hatten so den Vorteil, das Präparat projizieren zu können. Der Verbrauch an Antiserum wurde gesenkt von 2 ml auf 0.25 ml pro Analyse. Trotz dieser Verkleinerung war es möglich, etwa 25 Fraktionen darzustellen.

Ausgewertet werden die Peaks bei LAURELL mit der Flächenberechnung oder der Planimetrie. STEPHAN und FRAHM konnten zeigen, daß die einfache Höhenmessung der Peaks, bezogen auf eine gemeinsame Grundlinie, Ergebnisse liefert, die nur geringfügig ungenauer sind.

III. Eigene Versuche

1. Optimale Technik

Der Forderung, beide Serumproben unter möglichst gleichen Bedingungen zu untersuchen, wurde Rechnung getragen, indem das Plattenformat von 5 x 5 cm auf 10 x 5 cm verändert wurde. So war es möglich, zwei Serumproben in demselben Arbeitsgang unter angenähert denselben Verhältnissen zu behandeln. Zur Erläuterung siehe Abb. 5.



Abb. 5. LAURELL-EP im Originalformat.
Versuch Nr.8: Identisches Serumpaar

Die Glasplatten werden in vergälltem Äthanol entfettet. Wegen der Größe des Formats entfällt das Vorpinseln der Ränder oder der ganzen Platte; wie die Versuche gezeigt haben, schwimmt die Agarose bei vorsichtiger Behandlung während des Wässerns praktisch nie ab.

Nach STEPHAN und FRAHM werden pro Platte 4 ml Veronalpuffer bei 50° C im Wasserbad angewärmt. Das störende Phänomen der Elektro-Osmose reduziert man, indem man in Agarose arbeitet. Sie besitzt kaum freie Ladungen und ist deshalb geeigneter als Agar. 4 ml 2% Agaroselösung, die vorher 20 min. im Wasserbad gekocht wurden, werden zu den 4 ml Puffer gegeben, gemischt und waagerecht auf die Platte gegossen. Nach 2 Stunden kann die gegossene Platte schon verwendet werden; in der feuchten Kammer hält sie sich bis zu 2 Tage gebrauchsfähig.

Der Puffer wurde von STEPHAN und FRAHM übernommen:

Na-Veronal	77.0 g
Veronal	13.8 g
Ca-Lactat	3.85 g
+ eine Spur Cialit	
Aqua dest. ad 5000 ml	

Er hat den pH-Wert von 8.6 und ist 0.075 molar.

Nach der selbstentworfenen Schablone A (Abb. 6) wurden mit Stahlröhrchen von 1.4 mm Durchmesser die Auftragelöcher bei mittlerem Wasserstrahlsog gestanzt

und abgesaugt.

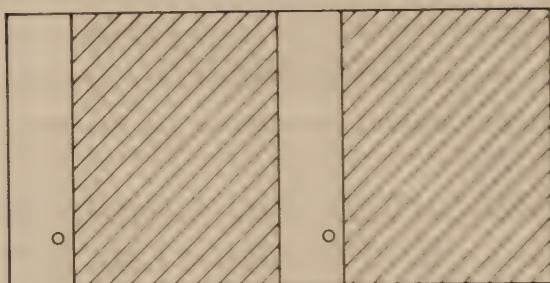


Abb. 6. Papierschablone A (Maßstab 1:1)

Die zu untersuchenden Serumproben werden 1+5 mit physiologischer NaCl-Lösung auf einen Proteinwert von etwa 1.25% verdünnt. 9 Teile dieser Serumverdünnung werden mit 1 Teil einer 0.2%igen Bromphenolblaulösung versetzt, um das Albumin zu markieren. Mit dieser Verdünnung wird ein optimales Antigen/Antikörper-Verhältnis erreicht. Von dieser Mischung werden pro Loch 1.5 ul mit einer graduierten Pipette aufgetragen.

Nachdem der Puffer 1:2 mit Aqua dest. verdünnt und in die Kammer eingefüllt wurde, kann der 1. EP-Schritt folgen: die Platte wird auf eine Kühlbox gelegt, die von durchfließendem Wasser gekühlt wird. Das Filterpapier (Schleicher & Schüll 2043 b mgl) wird so angebracht, daß es genau 1 cm auf der Agarose aufliegt. Dann wird die Spannung angelegt, und zwar 60 V/5 cm, das entspricht einer Feldstärke

von 12 V/cm. Wegen der dabei auftretenden starken Hitzeentwicklung ist die Kühlung unerlässlich. Ohne die hohe Feldstärke kann die besonders deutliche und scharfe Trennung während des 1. EP-Schrittes nicht erreicht werden.

Nach 50 min. ist das Albumin etwa 3.5 cm gelaufen. Damit ist der erste Schritt beendet. Die Spannung wird abgeschaltet, die Platte von der Kühlbox abgenommen, und mit einem Küchenmesser der überflüssige Agar nach Schablone A (Abb. 6) abgeschnitten (schraffierte Fläche) und entfernt. Die Glasfläche wird mit einem trockenen Lappen abgewischt und waagerecht gelegt (Nivelliertisch). Dann werden pro Platte 2.8 ml Puffer in 10 ml-Kölbchen bei 50° C temperiert. Dazu werden 2.8 ml 2% Agarose gegeben und etwa 5 min. so belassen. Jetzt können 0.5 ml Antihumanserum zugesetzt werden. Nach kurzem Mischen werden aus diesem Ansatz 2mal je 2.8 ml in kleine 6 ml-Kölbchen pipettiert, die ebenfalls vorher im Wasserbad temperiert wurden. Sofort anschließend gießt man deren Inhalt auf die freigemachten Stellen der waagerecht liegenden Platte vorsichtig aus (pro schraffierte Fläche ein Kölbchen).

Bei dem nun folgenden 2. EP-Schritt wird der Elektrodenpuffer umgepolt. Die Glasplatte wird um 90° im Uhrzeigersinn gedreht. Dann legt man die Filterpapiere an und läßt die EP bei 20 V/10 cm (= 2 V/cm) 15-18 Stunden über Nacht laufen. Bei

diesem Vorgang muß nicht mehr gekühlt werden.

Danach wird die Platte 48 Stunden in 0.9% NaCl-Lösung zum Auswaschen der überflüssigen Antikörper belassen. Mit Auflegen eines angefeuchteten Filterpapierblattes wird dann vorsichtig über Nacht getrocknet.

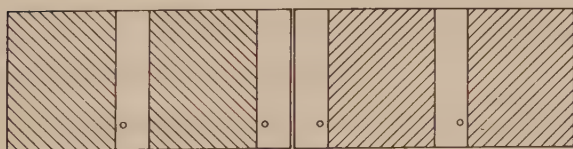
Nach Entfernen des Filterpapierblattes unter fließendem Wasser und einem kurzen Bad in Aqua dest. kann 7 min. in 0.5% Amidoschwarz gefärbt werden. Entfärbt wird in Methanol:Eisessig 9:1, bis keine Farbschleier mehr abgehen.

2. Vorversuche

Die Vorversuche galten vor allem dem Ziel, eine brauchbare und billige Apparatur zu entwickeln, da für die LAURELL-EP nur sehr teure Apparaturen im Handel sind. Zuerst wurde aus den oben erwähnten Überlegungen heraus das Format 5 x 10 cm entwickelt. Der nächste Schritt war die Konstruktion einer geeigneten Kühlbox. Sie bestand aus Messingblech mit den Maßen 5 x 9 x 17 cm. Zu- und Abfluß des Kühlwassers befanden sich an gegenüberliegenden Seiten, und zwar der Zufluß in einer Ecke unten, der Abfluß auf der anderen Seite in der gegenüberliegenden Ecke oben. Die Kühlbox hatte genau planparallele Flächen, war gespatelt und lackiert und mit einer dünnen Teflonschicht überzogen, um unerwünschte Nebenef-

fekte zu vermeiden und ein Höchstmaß an elektrischer Isolierung zu gewährleisten.

Die ersten Probeläufe zeigten, daß die Kühlung voll ausreichte. Allerdings traten Spannungsabfälle in der Mitte und ein starker Spannungsanstieg an den Enden der Platten auf. Der Grund dafür dürfte wohl in Stromschleifen liegen, die sich vor allem an den Enden der Platten ausbilden. Diese Unregelmäßigkeit wurde dadurch behoben, daß einmal die Filterpapiere für die Pufferbrücken peinlich genau zugeschnitten und gefalzt wurden, und daß außerdem immer zwei Platten gleichzeitig der EP unterworfen wurden.



Platte 1

Platte 2

Abb. 7. Schablone B (Maßstab 1:2)

Diese beiden Platten waren nach einer selbstentworfenen Schablone B (Abb. 7) gestanzt. Dadurch kamen die 4 Auftragslöcher der 2 Platten genau in die elektrisch konstante Zone, die geringen, noch auftretenden Spannungs- und Stromänderungen verliefen wirkungslos.

Allerdings konnte nicht verhindert werden, daß durch die starke zentrale Verdunstung das jeweils randständige Pherogramm einer Platte etwas schräg zur Mitte hochlief, das in der Mitte dagegen genau parallel dem schmalen Plattenrand lag, wie es sein sollte. Bei der Auswertung spielt das jedoch keine Rolle, da von der Linie aus gemessen wird, die die Basislinien der Albumin- und Transferrinkurven verbindet.

Bei der Auswertung wurde streng nach STEPHAN und FRAHM vorgegangen. Ein normales Immunophorogramm mit der LAURELL-EP sieht folgendermaßen aus:

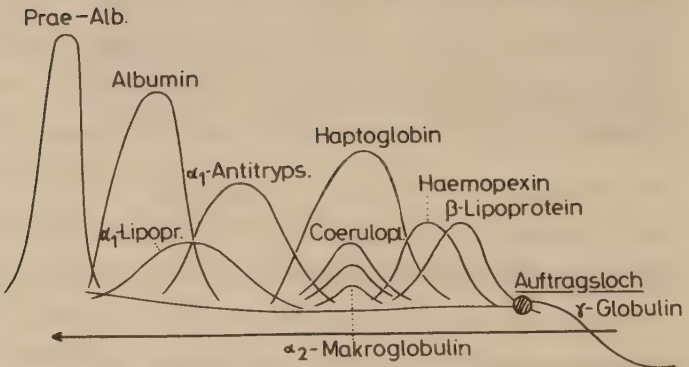


Abb. 8. Skizze einer normalen LAURELL-EP
(siehe auch Abb. 5)

Die Fläche der einzelnen Peaks ist der Konzentration der jeweiligen Proteine proportional. Es sind aber nur relative Mengenverhältnisse bestimmbar, es sei denn, man läßt eine standardisierte Präalbuminfraktion mitlaufen und berechnet dann aus den Größenverhältnissen und der bekannten Konzentration die gesuchten absoluten Mengen. Diese Methode ist allerdings zeitraubend und erlaubt außerdem nur eine Aussage über quantitative Vorgänge. Diese sind zwar auch manchmal genetisch bedingt (Hp nach WHITEHEAD u. A.), vor allem sind es aber die Wanderungsstrecke und die relative Lage der Peaks. Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit die Höhenmessung der Peaks nach STEPHAN und FRAHM angewandt, da die Planimetrie nur unwesentlich größere Genauigkeit bringt, wie aus der vergleichenden Arbeit von STEPHAN und FRAHM hervorgeht.

Als Nebentbefund verdient Erwähnung, daß auch bei dieser Methode Antihumanserum vom Pferd der Firma Molter mit Verfallsdatum von 2 Jahren vor Beginn dieser Versuche immer noch Ergebnisse lieferte, die denen mit frischem Antihumanserum (Behringwerke) durchaus vergleichbar waren (17 Peaks unterscheidbar). Die besten Ergebnisse lieferte allerdings ein Antihumanserum vom Kaninchen, das dann auch für die Hauptversuche verwendet wurde. Hierbei konnten bis zu 23 Peaks gezählt werden.

Die gesamte Apparatur bestand aus der Kühlbox,

zwei 20 cm langen Glasschalen, zwei 17 cm langen platinisierten Elektroden und einem Netzgerät, das es erlaubte, Spannungen bis zu 600 V abzunehmen.

Wichtig ist noch, 2 Tatsachen zu beachten:

1. Die Elektrophorese darf nur in Agarose vor sich gehen, da diese praktisch keinen elektro-osmotischen Effekt zeigt. In Agar würde die Darstellung völlig verzerrt und unvollständig.

2. Die γ -Globuline werden nicht dargestellt, da der pH-Wert, die Ionenstärke und die übrigen Bedingungen so gewählt sind, daß die Antikörper (die ja auch γ -Globuline sind) nicht wandern, sondern am Platz liegenbleiben. Das ist nötig, um die 1. EP-Front in eine mit Antiserum getränkte Agarose hineinwandern lassen zu können.

3. Hauptversuche

Es wurden je 5 ml Blut von zwei klinisch gesund erscheinenden geschlechtsverschiedenen erwachsenen Personen mit einer Venüle entnommen, nach der Gerinnung 5 min. bei 3000 U/min zentrifugiert und dann in der angegebenen Weise verdünnt und mit Bromphenolblau versetzt. Darauf wurden die Serumpaare 7mal mit der LAURELL-EP in der Modifikation nach STEPHAN und FRAHM untersucht. Viermal wurde eine Serumprobe doppelt aufgetragen, 3mal ein Serum gegen das fremde Serum. Die beiden EP-Schritte wurden in der oben

erwähnten Weise so exakt wie möglich ausgeführt.

Die Auswertung geschah zunächst nach WHITEHEAD. Dieser verglich die erhaltenen Peakmuster von Blutspuren in der Art, daß gleiche Peakmuster einfach als gleiches Blut galten, und Unterschiede jeder Art als Hinweis gewertet wurden, es handle sich um anderes Blut. Diese Art der Untersuchung war also eigentlich mehr ein Hinweis als eine Messung. Nun sind die Unterschiede bei frischem Blut nicht so extrem wie bei Blutspuren. Trotzdem konnte auch hier ohne systematische Messung gesagt werden, daß die identischen Serumproben sich weit ähnlicher sahen als nichtidentische. Diese subjektive Feststellung reicht jedoch nicht aus, um einen sicheren Identitätsnachweis zu führen (wie es z.B. bei der Gc-Bestimmung möglich ist), da es sich um komplexe Differenzen handelt, die auf diese Weise nicht exakt, d.h. quantitativ erfaßbar sind.

Um eine objektivere Auswertung zu bekommen, wurden in Anlehnung an STEPHAN und FRAHM die Peakhöhen und zusätzlich die Peaklaufstrecken gemessen. SAINT-PAUL u. A. behaupten, "daß sich 10 Peaks in ihrer genauen Gestalt erst bei 1:100 000 wiederholen" (Zitat wörtlich übersetzt - leider keine nähere Begründung). Es wurde angestrebt, ein Säulendiagramm von 10 verschiedenen Peaks zu bekommen, um dieser Behauptung nachzugehen. Dazu wurden die Platten mit der LAURELL-EP so auf ein weißes Papier ge-

legt, daß die Schichtseite das Papier berührte und die Fußpunkte des Albumins und Transferrins durch eine Linie verbunden wurden, die vorher auf das weiße Papier gezogen worden war. Von dieser Basislinie aus wurden nun die Höhen der ersten 10 Peaks, angefangen beim Albumin, mit dem Lineal gemessen. Bei der Messung der Wanderungsstrecke (S) der jeweiligen Peaks wurde mit einem rechten Winkel das Lot von der Spitze eines jeden der ersten 10 Peaks auf die Basislinie gefällt und anschließend die Entfernung dieses Lots zum Auftragspunkt bestimmt. Die Werte der beiden LAURELL-EP von jeweils ein und derselben Platte sollten dann miteinander verglichen werden. Für Platte 8 zeigt dies Tabelle IV.

Tab. IV. Meßwerte von Wanderungsstrecke und Peakhöhe, angegeben in cm. Methode siehe Text. Platte Nr. 8. Zweimal dasselbe Serum, unter gleichen Bedingungen untersucht.

Peak-Nr.	Höhe	S	Peak-Nr.	Höhe	S
1	19	25	1	23	28
2	4	24	2	5	27
3	9,5	20,5	3	12,5	23
4	6,5	21	4	8,5	24
5	3	16,5	5	4	20
6	6	16,5	6	7,8	20
7	6,5	16	7	8	19,5
8	8,5	14,5	8	10,5	18
9	9	14	9	11,5	17,5
10	9,5	13	10	11,5	16

Oberer Lauf

Unterer Lauf

Dieses Verfahren sollte ähnlich wie bei ROSE-MEYER zur Ermittlung eines relativen Differenzwertes führen, oberhalb dessen sich mit einer bestimmten statistischen Wahrscheinlichkeit Nichtidentität bescheinigen läßt, dementsprechend unterhalb davon die identischen Serumpaare liegen müßten.

Diese Untersuchung ist vor allem deshalb sinnvoller als die von LAUDEL u. A. angegebene Methode, weil es sich bei der "Antigen/Antibody Crossed Electrophoresis" um eine quantitative Methode handelt, die eine objektiv meßbare und reproduzierbare Feststellung ermöglicht.

Leider war es nur möglich, identische Serumproben in der angegebenen Weise auszuwerten. Bei verschiedenen Seren traten in der LAURELL-EP-Darstellung des einen Serums Peaks auf, die im anderen, damit zu vergleichenden Serum nicht zu entdecken waren oder mindestens nicht eindeutig zugeordnet werden konnten. Sie kamen dadurch für den quantitativen Vergleich nicht in Frage. Da aber immer die ersten 10 Peaks eines Serums, angefangen beim Albumin, miteinander verglichen werden sollten, konnte durch solche, "aus der Reihe fallende" Peaks die Reihenfolge des quantitativen Vergleichs nicht mehr fortgesetzt werden: es war nicht möglich, zu garantieren, daß auch wirklich nur sich entsprechende Peaks - wie z.B. der Haptoglobinpeak des einen Serums mit dem Haptoglobinpeak des anderen Serums - miteinander

verglichen wurden (und nicht etwa Transferrin einerseits mit Hämopexin andererseits, um ein extremes Beispiel zu wählen)! Die genaue Zuordnung wäre mit einer von STEPHAN und FRAHM 1971 angegebenen Methode möglich, bei der aber pro Versuch nur jeweils 3 Proteine mit speziellen Antiseren identifiziert werden können.

Demnach ist ein Vergleich zweier verschiedener Seren mit dieser Methode nicht so einfach, wie SAINT-PAUL u. A. behaupten. Um 10 Peaks von 2 Seren sicher einander zuordnen und miteinander vergleichen zu können, müßten pro Serum mindestens 3 LAURELL-EP mit insgesamt 9 speziellen Antiseren (die nicht ohne weiteres zu beschaffen sind) vorgenommen werden. Das hätte den Rahmen dieser Arbeit in Bezug auf Kosten und Arbeitsaufwand erheblich überschritten und keinerlei Vorteil gegenüber herkömmlichen Methoden der Serodiagnostik erbracht.

Auf eine mündliche Anregung von Dr. W. Becker, Behringwerke, hin (dem an dieser Stelle herzlich gedankt sei) wurde eine andere Technik erprobt. Dabei werden die beiden verschiedenen Serumproben in kurzem zeitlichen Abstand in demselben Startloch aufgetragen. Man geht dabei wie bei der gewöhnlichen LAURELL-EP vor, nur mit dem Unterschied, daß kurz nach Einschalten des ersten EP-Schrittes bei einer Albumin-Wanderungsstrecke von etwa $1/3$ bis $1/2$ cm die andere Serumprobe in dasselbe Startloch pipet-

tiert wird. Man erhält so eine doppelte IEP, wobei die Peaks von sich entsprechenden Proteinen ineinander übergehen und direkt vergleichbar sind.

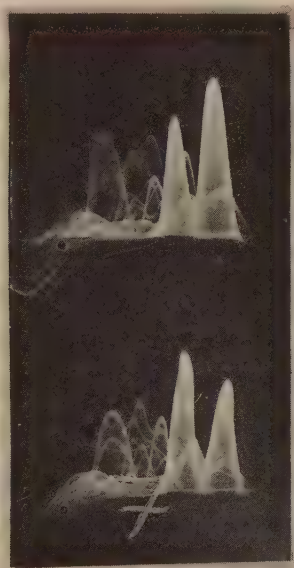


Abb. 9. Identische Seren aufgetrennt in der LAURELL-EP, modifiziert (1:1)

Wie aus Abb. 9 erkennbar, ist es aber wegen der Überlagerung der bis zu 23 doppelten - also 46 - Peaks nicht möglich, genaue Unterscheidungen zu treffen oder genau die jeweiligen Peaks einander zuzuordnen, vor allem nicht im Bereich zwischen Albumin und Hämoexin. Dies deshalb, weil es durch die dichte Überlagerung nicht möglich ist, die ineinander übergehenden Linien zweier sich entsprechender

Peaks von dicht angelagerten anderen Linien, die nur um ein geringes Maß verschoben sind, abzugrenzen. Diese Darstellungsart ist daher mehr zur Untersuchung einzelner Proteine geeignet; für Versuche, die das gesamte Proteinspektrum darstellen wie im vorliegenden Falle, ist das Präzipitationsbild zu unübersichtlich.

4. Besprechung

Abschließend kann gesagt werden, daß auch die Methode nach LAURELL und STEPHAN und FRAHM zur Prüfung der Frage von Identität oder Nichtidentität zweier Serumproben mit dem beschriebenen Auswertungsverfahren nicht geeignet ist. Die Methode bietet sich zwar an wegen der Möglichkeit, sie objektiv und quantitativ anzuwenden; es ist aber nicht möglich, ohne weiteres bei verschiedenen Serumproben die Serumfraktionen (Peaks) des einen und anderen Serums einander genau zuzuordnen und so zu vergleichen. Bei identischen Serumproben ist dies begrenzt möglich. Um mit Sicherheit Aussagen machen zu können, müßte aber ein von STEPHAN und FRAHM angegebenes Identifizierungsverfahren von Peaks angewendet werden, das im Rahmen dieser Fragestellung zu aufwendig ist.

Auch eine neue (unveröffentlichte) Technik nach W.BECKER (Behringwerke) brachte hier kein besseres Resultat. Die Zuordnung von Serumfraktionen zweier

Seren ist hierbei im Falle der Darstellung des gesamten Serumproteinspektrums nicht möglich, weil das Bild durch Überlagerung der Peaks zu unübersichtlich wird.

Jeder Versuch mit der LAURELL-EP ist sehr aufwendig und kostspielig (pro Platte etwa 15,-DM) und somit als Routinemethode, abgesehen vom ungenügenden Entwicklungsstand der Auswertungsmethoden, vorläufig noch ungeeignet.

Die Methode der LAURELL-EP, vor allem in der Modifikation nach W.BECKER, bietet sich dagegen an für Untersuchungen einzelner oder weniger Proteine mit speziellen Antiseren; auf diesem Gebiet sind hinsichtlich genetischer Polymorphismen neue Ergebnisse zu erwarten, vor allem wegen der Empfindlichkeit der Darstellung (mehr Fraktionen als mit den bisher üblichen IEP) und wegen der Möglichkeit, quantitativ auszuwerten und objektive, reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen.

D. Zusammenfassung

Frühere Untersucher hatten angegeben, daß menschliche Seren sich auf Grund des immunelektrophoretischen Bildes individuell differenzieren lassen. Die vorangehende Marburger Dissertation von ROSEMEYER konnte diese Behauptung unter bestimmten Voraussetzungen bestätigen und ließ erhoffen, daß eine weitere Verfeinerung der Methodik die serologische Diagnose "Verwandtschaft" oder "Nichtverwandtschaft" in einem einzigen Untersuchungsgang gestatten würde.

Für die eigenen Untersuchungen wurde die ROSEMEYERSche Technik übernommen, die einzelnen Schritte wurden jedoch verbessert, vor allem wurden die Präzipitate durch Vorbehandlung im Schüttelapparat deutlicher herausgebracht, und die Präzipitatzählung wurde standardisiert. Nach exakter Ausarbeitung aller Methodenschritte ließen sich jedoch wider Erwarten keine reproduzierbaren Ergebnisse erzielen. Diese Feststellung ließ sich durch die Resultate mehrerer Blindversuche bestätigen. Selbst nach - an sich unstatthafter - Aussonderung zweifelhafter Pherogramme verblieb noch ein Überlappungsbereich von 25% zwischen immunelektrophoretischer Identität und Nichtidentität. Der Aufwand an Zeit, Material und Mühe stand in keinem angemessenen Verhältnis zu diesem Ergebnis, so daß diese Methodik für die Praxis ungeeignet ist.

In anschließenden Versuchen wurde die Methodik der "zweidimensionalen" Immunelektrophorese nach LAURELL für die Fragestellung erprobt, ebenfalls unter Verbesserung einzelner

Arbeitsgänge und Messung der Peak-Höhen und Peak-Laufstrecken. Auch dieses (sehr kostspielige) Verfahren erwies sich aber für die Diagnose "verwandt" oder "nichtverwandt" als vorläufig unbrauchbar.

Alles in allem haben sämtliche Versuche im Rahmen der Dissertation im Gegensatz zu den Voruntersuchern die Nichtobjektivierbarkeit einer Übereinstimmung oder Differenz zweier Serien mittels qualitativer und quantitativer Immunelektrophorese in einem einzigen Übersichtspherogramm ergeben, und zwar wegen der Streuungen der Meßwerte und der nachgewiesenen, bisher unvermeidlichen Fehlerquellen.

Addendum

Nach Abschluß der vorliegenden Studie erschien eine Veröffentlichung, in der die Fragestellung mit anderer Technik angegangen wurde (S.GUSSMANN und F.SCHWARZFISCHER: Vererbung der Quantität einiger Serumproteinfraktionen des Menschen, Z.Rechtsmedizin 72, 312-318, 1973). Die Autoren werteten Serumpherogramme der Hochspannungselektrophorese densitometrisch aus und berechneten durch Planimetrieren die relative Konzentration einiger Serumproteine. Anhand eines Ähnlichkeitsvergleichs mittels χ^2 -Tests an Familien aus Gutachtenmaterial wird die Vererbung der Quantität einiger Serumproteinfraktionen des Menschen dargestellt. Da die Kinder in dem untersuchten Familienmaterial nur mit jeweils einem Elternteil Ähnlichkeit aufwiesen, wäre bei Eignung und Anwendung dieser Technik in Vaterschaftsgutachten in 30% der Fälle ein positiver Hinweis zu erwarten.

Diese vielversprechenden Resultate wurden dadurch ermöglicht, daß die von S.GUSSMANN und F.SCHWARZFISCHER angewandte Hochspannungselektrophorese im Gegensatz zu der in der vorliegenden Arbeit verwandten zweidimensionalen Immunelektrophorese nach LAURELL die Eiweißfraktionen des menschlichen Serums ohne Überlagerung voneinander trennt. So können einzelne, geeignete Fraktionen sicher identifiziert und verglichen werden, während Fraktionen, die Tagesschwankungen

oder andere Veränderungen aufweisen können, unberücksichtigt bleiben. Ein weiterer Vorteil der Hochspannungselektrophorese ist der geringe Kostenaufwand, da hier keine Immunsereen benötigt werden.

Wie S.GUSSMANN und F.SCHWARZFISCHER selbst betonen, muß ihre Hypothese noch an einem größeren Untersuchungsgut mit echten Familien nachgeprüft werden. Ferner könne der Geschlechtsdimorphismus eine Rolle spielen. Schließlich müßten die Befunde auch von anderen Untersuchern bestätigt werden.

E. Literatur

CLARKE, H. and T. FREEMAN: A Quantitative Immunelectrophoresis Method (LAURELL Electrophoresis). Prot. Biol. Fluids 14, 503, 1966

CLARKE, H. and T. FREEMAN: Quantitative Immunelectrophoresis of Human Serum Proteins. Clin. Sci. 35, 403, 1968

CONSDEN, R. and J. KOHN: Cellulose Acetate as a Medium for Immuno-diffusion. Nature 183, 1512, 1959

DUCKSTEIN, G.: Immunelektrophoretische Untersuchungen am chirurgischen Krankengut. Diss. Göttingen 1963

FIRESTONE, J. and S. ARONSON: A thin Gel quantitative two-dimensional Immunelectrophoretic Method. Amer. J. Clin. Path. 52, 615, 1969

GANROT, P. and B. SCHERSTEN: Serum α_2 -Macroglobulin Concentration and its Variation with Age and Sex. Clin. Chim. Acta 15, 113, 1967

GRABAR, P. et E. WILLIAMS: Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de protéines. Biochem. biophys. Acta 10, 193, 1953

HILGERMANN, R.: Erfahrungen über die optimale Diagnostik und Darstellung der Gc-Typen. Z. klin. Chem. 6, 317, 1967

HILGERMANN, R.: Veränderungen der Gc-Varianten durch enzymatische Einwirkungen. Z. klin. Chem. 7, 617, 1969

HUMMEL, K. und H. MIRMIRAN: Vergleichende Untersuchungen an Immunopherogrammen verwandter und nichtverwandter Personen. Proceed. 10th Congr. Int. Soc. Blood Transf., Stockholm 1964, 396, 1965

KÜHN, R.: Möglichkeiten und Grenzen immunelektrophoretischer Untersuchungen. Z. ges. inn. Med. 21, 545, 1966

LAUDEL, A., B. GRUNBAUM and P. KIRK: Individuality of Human Serum by Immunelectrophoresis. Science 137, 862, 1962

LAURELL, C.: Antigen-Antibody crossed Electrophoresis. Annal. Biochem. 10, 358, 1965

OUCHTERLONY, O.: Antigen-Antibody Reactions in Gels. Acta path. microbiol. Scand. 26, 507, 1949

PROKOP, O., D. PATZELT und A. RACKWITZ: Kriminallistische Hinweise durch die Immunelektrophorese menschlicher Seren. Immuninformation 1, 29, 1971

ROSEMEYER, D. und F. SCHLEYER: Sind immunelektrophoretisch dargestellte Serumproteinmuster individuell determiniert? Z. Immun.-Forsch. 141, 274, 1971

ROSEMEYER, D.: Immunelektrophoretische Untersuchungen über die Identität menschlicher Seren. Diss. Marburg, 1970

SAINT-PAUL, M., P. REBEYROTTE, L. DÉROBERT, J. PEILLET et J. LABBE: Intérêt de l'immuno-electrophorèse bidimensionnelle en médecine légale. Méd. lég. et Dommage corp. 4, 126, 1971

SCHEIDEGGER, J.: Une microméthode de l'immuno-électrophorèse. Int. Arch. Allergy 7, 103, 1955

SCHNEIDER, W. und H. BERNDT: Praktikum und Atlas der Immunelektrophorese. München (Lehmann) 1969

SCHULTZE, H. and J. HEREMANS: in "The Molecular Biology of Human Proteins" Vol. 1, Elsevier (Amsterdam) 1966, zit. nach WHITEHEAD

SMITHIES, O.: Zone Electrophoresis in Starch-Gels: Group Variations in the Serum Proteins of normal Human Adults. Biochem. J. 61, 629, 1955

STEPHAN, W. und U. FRAHM: Eine Methode zur Identifizierung und Zuordnung von LAURELL-Elektrophorese-Peaks. Z. klin. Chem. 8, 391, 1970

STEPHAN, W. und U. FRAHM: Quantitative Immunelektrophorese. Eine Mikromethode zur Routinebestimmung der Serumproteine. Z. klin. Chem. 8, 469, 1970

WHITEHEAD, P., S. KIND, P. MORRIS, M. DAVIES and R. CLEEVELY: The Examination of Bloodstains by LAURELL-Elektrophoresis (Antigen-Antibody Crossed Electrophoresis). J. For. Sci. Soc. 10, 83, 1970

WIEME, R.: in "Agar Gel Electrophoresis", Elsevier (Amsterdam) 1965

WUNDERLY, C.: Die Immunelektrophorese in Agar-Gel. Experientia 13, 421, 1957

Lebenslauf

Am 15. Oktober 1950 wurde ich als ältester von fünf Söhnen des Arztes Dr.med. Heinrich Oepen und seiner Ehefrau Irmgard, geb. Vollmer, in Freiburg/Breisgau geboren.

Von 1956 bis 1959 besuchte ich die Volksschule in Eresing bei Landsberg am Lech, wohin meine Eltern wegen besserer Arbeitsmöglichkeiten meines Vaters in München umgezogen waren. Nach kurzem Besuch der Sexta des Wittelsbacher Gymnasiums in München 1960 zogen wir ein zweites Mal um nach Marburg/Lahn, wo ich das Gymnasium Philippinum besuchte und 1968 das Abitur ablegte.

Im Wintersemester 1968 begann ich mit dem Studium der Medizin an der Philipps-Universität Marburg und bestand nach dem Sommersemester 1969 das Vorphysikum. Danach setzte ich mein Studium in Fribourg/Schweiz fort. Dieser Auslandsaufenthalt wurde mir durch die Studienstiftung des Deutschen Volkes ermöglicht, die mich seit meinem zweiten Semester in großzügiger Weise gefördert hat. In Fribourg bestand ich nach weiteren drei Semestern im Frühjahr 1971 die ärztliche Vorprüfung. Anschließend belegte ich die klinischen Semester an der Albert-Ludwigs-Universität in Freiburg/Breisgau bis zum Staatsexamen nach dem Wintersemester 1973/74.

Herrn Prof. Dr. med. F. Schleyer danke ich
für die Überlassung des Themas, für seine Anregungen und
seine Beratung bei der Abfassung der Dissertation.

Herrn Dr. med. R. Hilgermann und Herrn Prof.
Dr. med. W. Schiff danke ich für freundliche Hinweise.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten:

in Marburg: Ammon, Dänicke, Dimroth, Koecke, Nultsch, Petri,
Vogell, Walcher, Wehmeier

in Fribourg/Schweiz: Condrau, Conti, Faller, Fraefel, Haab,
Held, Jaeger, Laszt, Müller, Pasquier, Portmann,
Sprumont

in Freiburg/Breisgau: Beck, Bernauer, Degkwitz, Faust, Forster, Gerok, Haas, Hepp, Herfart, Hillemanns, Hummel, Jung, Kalkoff, Kommerell, Kretschmar, Kuenzer, Löhr, Mackensen, Musshoff, Noetzel, Sandritter, Schwaiger, Staib, Stange, Thomas, Vogel, Wenz, Wuermeling, Zimmermann

These institutions were among the first to be organized and
operated.

In 1850, the first school was opened, and in 1851

the first church was organized.

In 1852, the first school was opened, and in 1853

the first church was organized.

and in 1854

the first school was opened, and in 1855

the first church was organized.

and in 1856

the first school was opened, and in 1857

the first church was organized.

and in 1858

the first school was opened, and in 1859

